发酵底物锰含量对牦牛体外瘤胃发酵的影响

刘慧丽[1,2,3] 薛艳锋[1,2,3*] 郝力壮[1,2,3**] 刘书杰[1,2,3**] 柴沙驼[1,2,3] 张晓卫[1,2,3]

（1.省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室，青海省高原放牧家畜动物营养与饲料科学重点实验室，西宁 810016；2.青海高原牦牛研究中心，西宁 810016；3.青海大学畜牧兽医科学院，西宁 810016）

摘 要：为确定牦牛微量元素锰的需要量，本试验以甘氨酸锰为添加形式，研究不同发酵底物锰含量对牦牛体外瘤胃发酵的影响。共设定 5 个发酵底物锰含量，分别为 35.00、40.00、50.00、60.00 和 70.00 mg/kg，采用体外瘤胃发酵技术进行 48 h 发酵，结束后测定产气量、瘤胃发酵特性以及消化酶活力。结果表明：1）当锰含量为 40.00 mg/kg 时，发酵液氨态氮、微生物蛋白质、乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸和总挥发性脂肪酸含量均达到最大值，分别为 10.60 mg/dL、3.90 g/L、47.12 mmol/L、19.45 mmol/L、0.35 mmol/L、5.41 mmol/L、0.96 mmol/L、0.50 mmol/L 和 72.24 mmol/L；2）当锰含量为 50.00 mg/kg 时，发酵液脂肪酶活力达最大值，为 0.50 U/mL，乙酸/丙酸最低，为 2.05。综合可得，出对于生长期牦牛，若以甘氨酸锰作为锰元素添加形式，推荐牦牛饲粮锰含量在 40.00～50.00 mg/kg，有利于瘤胃发酵和饲草料降解。

关键词：牦牛；甘氨酸锰；体外瘤胃发酵；消化酶活力

中图分类号：S823

牦牛作为高原的特有物种，在严酷的自然环境下具有高免疫性、抗逆性和快速适应性等特点[1]，其绒、乳、肉等为牧民提供了主要的物质生活资料。一直以来，牦牛的生存主要依靠于天然草场，低产犊率、低生长速率、冷季掉膘严重等问题严重制约着牦牛产业的发展。因此近些年来，牦牛的冷季补饲越来越受到研究者和牧民的关注，科学配制牦牛饲粮也显得尤为重要。关于牦牛能量和蛋白质营养方面已经有一定量的研究[2-3]，但是关于牦牛微量元素锰方面的研究基本上处于空白状态。锰作为微量元素的一种，是动物生命活动中所必需的微量元素之一。锰能促进骨骼发育[4-5]，参与造血[6]，增强细胞免疫功能[7-8]，是很多酶类的组成成分[9]。郗丽兰[10]报道，牛对饲粮锰的需要量为 46.40～48.40 mg/kg。庄怀飞等[11]研究了不同饲粮锰、铜含量下荷斯坦公牛抗氧化指标的变化，结果表明饲粮锰的适宜含量为 50.00 mg/kg。纪守坤等[12]的研究表明，公羔羊和母羔羊对锰的维持需要量分别为 0.29 和 0.22 g/d，折算成每千克饲粮干物质大约分别为 116 和 88 mg/kg。本研究通过体外瘤胃发酵技术探究 35~70 mg/kg 的甘氨酸锰对生长期牦牛瘤胃发酵的影响，旨在得出生长期牦牛饲粮中锰微量元素的适宜含量，进而完善牦牛饲养标准，为科学地配制牦牛补饲饲粮提供理论依据，促进牦牛产业的发展。

1 材料与方法

收稿日期：2017-07-06

基金项目：国家国际科技合作专项项目（2015DFG31870）；国家重点研发计划项目（2016YFD0500504）；国家自然科学基金（31660673）；国家重点基础研究发展计划“973 项目”（2012CB722906）；青海省重大科技平台建设项目（2013-Z-Y03）；国家科技支撑计划项目（2012BAD13B01）；公益性行业(农业)科研专项（201203008）

作者简介：刘慧丽（1993—），女，青海乐都人，硕士研究生，从事动物营养与饲料科学研究。E-mail: 1729956222@qq.com

*同等贡献作者

**通信作者：郝力壮，副教授，E-mail: lizhuanghao1122@foxmail.com；刘书杰，研究员，硕士生导师，E-mail: mkylshj@126.com

1.1　试验动物与饲养管理

选择 3 头健康、体况接近、装有永久性瘤胃瘘管的大通阉牦牛作为试验动物。试验饲粮包括精料和粗料（燕麦青干草），精粗比 60:40，单头饲喂，每日 2 次（08:00、18:00），自由饮水。预饲 15 d 之后，清晨空腹采集瘤胃液。

1.2　发酵底物

参考我国《肉牛饲养标准》（NY/T 815-2004）和文献[13]，按照 150 kg 牦牛日增重 500 g 设计牦牛基础饲粮，以燕麦青干草作为粗料，精粗比为 60:40，以此饲粮为发酵底物，发酵底物组成及营养水平见表 1。

表 1　发酵底物组成及营养水平(干物质基础)

Table 1　Composition and nutrient levels of fermented substrate (DM basis)　　%

原料 Ingredients	含量 Content	营养水平 Nutrient level	含量 Content
玉米 Corn	36.00	干物质 DM	90.98
小麦麸 Wheat bran	12.00	粗蛋白质 CP	11.03
大豆粕 Soybean meal	6.60	酸性洗涤纤维 ADF	17.60
菜籽粕 Rapeseed meal	2.13	中性洗涤纤维 NDF	31.12
石粉 Limestone	0.90	钙 Calcium	0.88
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	0.17	磷 Phosphorus	0.19
食盐 NaCl	0.58	锰 Manganese/(mg/kg)	33.82
燕麦青干草 Dried oat green hay	40.00		
合计 Total	100.00		

1.3　试验设计

采用单因素试验设计，共 5 个处理，每个处理设 3 个重复。以甘氨酸锰（由长沙兴嘉生物工程有限公司提供，纯度为 21%，产品编号 2015071810）形式在发酵底物中添加锰，使锰含量分别达到 35.00、40.00、50.00、60.00、70.00 mg/kg（干物质基础），其他微量元素铁、锌、硒、铜和碘的含量一致，分别为 5.26、6.27、0.04、4.40 和 0.00 mg/kg（干物质基础）。

1.4　体外瘤胃发酵

按照 Menke 等[14]的方法制备人工瘤胃液，按照表 2 中各溶液的配方分别配制微量元素溶液（A 液），缓冲液（B 液），常量元素溶液（C 液），指示剂和还原液。按照顺序依次向 2 L 的玻璃广口瓶中加入 667 mL 的超纯水，0.17 mL 的 A 液，333 mL 的 B 液，333 mL 的 C 液，1.70 mL 的指示剂，67 mL 的还原液，配制人工瘤胃液。30 mL 人工瘤胃液和 200 mg 发酵底物共同装入发酵管中，放入人工瘤胃培养箱，（39±0.5）℃开始发酵[15-16]，分别在培养 2、4、6、8、12、14、16、24、30、36、48 h 读取每个发酵培养管的刻度并记录。

表 2　人工瘤胃液各单一溶液的配方

Table 2　Each single solution’s formula of artificial rumen buffer

微量元素溶液（A 液） Micro-element solution （solution A）	缓冲液（B 液） Buffer （solution B）	常量元素溶液（C 液） Macro-element solution （solution C）	指示剂 Indicator	还原液 Deoxidizer solution

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 6.60 g、$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.50 g、$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 4.00 g，加超纯水至 50 mL	NH_4HCO_3 0.80 g、$NaHCO_3$ 7.00 g，加超纯水至 200 mL	Na_2HPO_4 1.14 g、KH_2PO_4 1.24 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.12 g，加超纯水至 200 mL	刃天青 100 mg 加超纯水至 100 mL，避光保存	NaOH 0.16 g、$Na_2S \cdot 9H_2O$ 625.00 mg，加超纯水至 100 mL，现用现配

1.5 测定指标与测定方法

1.5.1 锰含量的测定

锰含量参考 GB/T 13885-2003[17]测定，使用 TAS-990 原子吸收分光光度计测定发酵底物中微量元素锰含量。锰含量标准曲线为：

$$Abs=0.182\ 90Conc.+0.003\ 140\ 0(r=0.999\ 7，n=4)。$$

式中：*Conc.*为锰含量(μg/mL)，*Abs* 为吸光度值。

1.5.2 产气量、pH、干物质消失率（DMD）及微生物蛋白质（MCP）和氨态氮（NH_3-N）含量的测定

发酵底物产气量和 DMD 采用以下公式计算：

产气量（mL）=某时间点培养管产气量（mL）−对应时间点空白管产气量（mL）；

DMD（%）=[（样本 DM 重-残渣 DM 重+空白管 DM 重）/样本 DM 重]×100。

发酵液 pH 的测定使用 HANNA-HI221 高精密酸度计进行。发酵液 MCP 含量用南京建成生物研究所提供的试剂盒测定。发酵液 NH_3-N 含量采用冯宗慈等[18]改进的比色法测定。

1.5.3 甲烷产量、VFA 含量的测定

甲烷产量参考文献[19-20]测定，使用气相色谱仪（GC-2014，日本岛津公司）测定体外瘤胃发酵所产生的气体中的甲烷含量，进而计算甲烷产量。测定条件：火焰氢离子检测器（FID），色谱柱为毛细管柱（FFAP,30.00 m×0.32 mm,0.50 μm）；色谱柱温度为 100 ℃，恒温模式；汽化室温度 100 ℃；FID 温度 110 ℃；进样量 100 μL；载气为高纯氮气（99.99%），压力 0.7 MPa；氢气压力 0.4 MPa，空气压力 0.4 MPa；毛细管柱压力 65 kPa，分流比 40∶1。

本试验所使用的甲烷标准气体委托兰州华特化工供应站生产，气体成分如表 3 所示。

表 3 甲烷标准气体成分

Table 3 Composition of methane standard gas %

编号 No.	二氧化碳 CO_2	甲烷 CH_4	氢气 H_2	氧气 O_2	氮气 N_2
1	75.30	20.65	1.98	2.07	0.00
2	49.28	10.67	0.51	0.50	39.03
3	19.80	4.91	0.10	0.10	75.08

本试验所拟合的甲烷标准曲线为 Y=249 833X+78 225.5（r=0.999）[Y 为进样的峰面积，X 为甲烷含量（mmol/L）]。

VFA 含量参考文献[21-22]测定。样品的前处理：发酵液经 4 层纱布过滤后，取 5 mL 于干净的离心管中，3 000 r/min 离心 10 min，取上清液 2 mL 于离心管中，准确加入 0.2 mL、25%的偏磷酸溶液，混匀之后，静置 10 min 充分反应，之后在 12 000 r/min、4 ℃的条件下离心 10 min，转移上清到新的离心管中，-80 ℃冻存，备用。

用气相色谱仪测定 VFA 含量。测定条件：FID，色谱柱为毛细管柱（FFAP，30.00 m×0.32 mm，0.50 μm）；色谱柱升温程序，初始 60 ℃，以 10 ℃/min 升温至 120 ℃，保留 2 min，以 15 ℃/min 升温至 180 ℃，保留 5 min；汽化室温度 250 ℃；FID 温度 250 ℃；进样量 1 μL，载气为高纯氮气（99.99%），压力 0.7 MPa；氢气压力 0.4 MPa，空气压力 0.4 MPa，毛细管柱压力 0.6～0.8 MPa，分流比 40∶1。本试验所拟合的 VFA 含量标准曲线见表 4。

表 4 VFA 含量标准曲线

Table 4 Standard curves for VFA contents

项目 Items	标准曲线 Standard curve	相关系数 *r*
乙酸 ACE	*Y*=5 786.42*X*+2 033.80	0.99
丙酸 PRO	*Y*=10 963.30*X*+8 405.98	0.99
异丁酸 ISOB	*Y*=27 051.50*X*+2 576.41	0.99
丁酸 BUTY	*Y*=16 064.80*X*+8 525.77	0.99
异戊酸 ISOV	*Y*=25 745.30*X*+3 052.60	0.99
戊酸 VAL	*Y*=22 200.90*X*+4 885.26	0.99

Y 为进样的峰面积，*X* 为组分含量（mmol/L）。

Y was peak area of sample， and *X* was component content （mmol/L）.

1.5.4 淀粉酶（AMS）、脂肪酶(LPS)、胰蛋白酶(TYS)和纤维素酶(CLS)活力的测定

AMS、LPS、TYS 和 CLS 活力测定用南京建成生物研究所提供的试剂盒。单位定义：每毫升含酶溶液在 37 ℃下与底物作用 30 min，水解 10 mg 淀粉定义为 1 个 AMS 活力单位；每毫升含酶溶液在 37 ℃下与底物反应 1 min，每消耗 1 μmol 底物定义为 1 个 LPS 活力单位；每毫升含酶溶液在 pH 8.0、37 ℃的条件下，每分钟使反应体系的吸光度值变化 0.003 定义为 1 个 TYS 活力单位；每毫升含酶溶液每分钟催化产生 1 μg 葡萄糖定义为 1 个 CLS 活力单位。

1.6 统计分析

采用 Excel 2007 进行数据的初步整理，采用 SAS 9.1.3 软件中 ANOVA 程序进行单因素方差分析，采用 Duncan 氏法进行多重比较。试验数据均以平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 产气量、甲烷产量、DMD 及发酵液 pH

从表 5 中可以看出，随着锰含量的升高，产气量呈现降低趋势，发酵液 pH 呈现升高趋势，DMD 呈现先上升后下降的趋势。产气量在锰含量为 35.00 mg/kg 时处于最高值 73.80 mL，在锰含量为 40.00 mg/kg 时处于次高值 72.80 mL，锰含量为 35.00、40.00、50.00 和 60.00 mg/kg 时产气量差异不显著（P>0.05），但这 4 个处理均显著高于锰含量为 70.00 mg/kg 时（P<0.05）。甲烷产量在锰含量为 60.00 mg/kg 时达到最大值 8.01 mL，显著高于锰含量为 35.00、40.00 和 50.00 mg/kg 时（P<0.05），但与锰含量为 70.00 mg/kg 时差异不显著（P>0.05）。DMD 在锰含量为 60.00 mg/kg 时达到最大值 68.73%，显著高于锰含量为 35.00 和 70.00 mg/kg 时（P<0.05），但与锰含量为 40.00 和 50.00 mg/kg 时差异不显著（P>0.05）。发酵液 pH 在锰含量为 70.00 mg/kg 时达到最大值 7.49（P<0.05），显著高于锰含量为 35.00 和 40.00 mg/kg 时（P<0.05），但与锰含量为 50.00 和 60.00 mg/kg 时差异不显著（P>0.05）。

表 5 发酵底物锰含量对体外瘤胃发酵产气量、甲烷产量、DMD 及发酵液 pH 的影响

Table 5 Effects of manganese content of fermentation substrate on gas production, methane production, DMD and fermentation fluid pH of *in vitro* rumen fermentation

项目	锰含量 Manganese content/(mg/kg)					*P* 值
Items	35.00	40.00	50.00	60.00	70.00	*P*-value
产气量 Gas production/mL	73.80±6.20^{a}	72.80±3.30^{a}	71.00±4.00^{a}	72.20±4.40^{a}	57.70±9.80^{b}	0.04
甲烷产量 Methane production/mL	6.52±0.29^{ab}	5.43±0.62^{a}	5.85±1.17^{ab}	8.01±1.32^{c}	7.12±1.60^{bc}	<0.01
干物质消失率 DMD/%	45.23±1.03^{a}	63.86±10.28^{bc}	60.35±7.50^{abc}	68.73±12.66^{c}	50.81±6.32^{ab}	0.04
pH	7.03±0.03^{a}	7.04±0.21^{a}	7.23±0.09^{ab}	7.30±0.19^{b}	7.49±0.04^{b}	0.01

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著（P<0.05），相同或无小写字母表示差异不显著（P>0.05）。下表同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05), while with the same small or no letter superscripts mean no significant difference (P>0.05). The same as below.

2.2 发酵液 NH_3-N 和 MCP 含量

从表 6 中可以看出，随着锰含量的升高，发酵液 NH_3-N 和 MCP 含量呈现先上升后下降的趋势。发酵液 NH_3-N 含量在锰含量为 40.00 mg/kg 时达到最大值 10.60 mg/dL，显著高于锰含量为 50.00、60.00 和 70.00 mg/kg 时（$P<0.05$），但与锰含量为 35.00 mg/kg 时差异不显著（$P>0.05$）。发酵液 MCP 含量在锰含量为 40.00 mg/kg 时达到最大值 3.90 g/L，显著高于锰含量为 35.00、60.00 和 70.00 mg/kg 时（$P<0.05$），但与锰含量为 50.00 mg/kg 时差异不显著（$P>0.05$）。

表 6　发酵底物锰含量对体外瘤胃发酵发酵液 NH_3-N 和 MCP 含量的影响

Table 6　Effects of manganese content of fermentation substrate on NH_3-N and MCP contents of fermentation fluid of *in vitro* rumen fermentation

项目	锰含量 Manganese content/(mg/kg)					*P* 值
Items	35.00	40.00	50.00	60.00	70.00	*P*-value
氨态氮 NH_3-N/(mg/dL)	10.25±1.39^{b}	10.60±0.95^{b}	7.70±0.91^{a}	7.49±0.79^{a}	6.42±1.09^{a}	<0.01
微生物蛋白质 MCP/(g/L)	1.17±0.551^{a}	3.90±1.103^{c}	3.51±0.55^{bc}	2.73±0.55^{b}	1.17±0.55^{a}	<0.01

2.3 发酵液消化酶活力

从表 7 中可以看出，随着锰含量的升高，发酵液 AMS、LPS、TYS 活力呈现先上升后下降的趋势，发酵液 CLS 活力呈现上升趋势。发酵液 AMS 活力在锰含量为 60.00 mg/kg 时达到最大值 0.51 U/mL，显著高于锰含量为 35.00、40.00 和 50.00 mg/kg 时（$P<0.05$），但与锰含量为 70.00 mg/kg 时差异不显著（$P>0.05$）；发酵液 LPS 活力在锰含量为 50.00 mg/kg 时达到最大值 0.50 U/mL，显著高于其他处理（$P<0.05$），锰含量为 40.00、60.00 和 70.00 mg/kg 时差异不显著（$P>0.05$），但显著高于锰含量为 35.00 mg/kg 时（$P<0.05$）；发酵液 TYS 活力在锰含量 60.00 mg/kg 时达到最大值 65.46 U/mL，显著高于锰含量为 35.00 mg/kg、70.00 mg/kg 时（$P<0.05$），但与锰含量为 40.00 mg/kg、50.00 mg/kg 时差异不显著（$P>0.05$）。发酵液 CLS 活力各处理间差异不显著（$P>0.05$），在锰含量为 70.00 mg/kg 时达到最大值 81.12 U/mL。

表 7　发酵底物锰含量对体外瘤胃发酵发酵液消化酶活力的影响

Table 7　Effects of manganese content of fermentation substrate on activities of digestive enzymes of fermentation fluid of *in vitro* rumen fermentation　　U/mL

项目	锰含量 Manganese content/(mg/kg)					*P* 值
Items	35.00	40.00	50.00	60.00	70.00	*P*-value
淀粉酶 AMS	0.29±0.01^{a}	0.31±0.10^{a}	0.23±0.08^{a}	0.51±0.09^{b}	0.50±0.02^{b}	<0.01
脂肪酶 LPS	0.42±0.02^{a}	0.47±0.02^{b}	0.50±0.02^{c}	0.46±0.03^{b}	0.46±0.00^{b}	<0.01
胰蛋白酶 TYS	32.71±8.10^{a}	60.79±8.10^{bc}	51.44±8.10^{bc}	65.46±8.10^{c}	46.76±8.10^{ab}	<0.01
纤维素酶 CLS	55.62±3.48	78.80±16.43	76.48±3.48	77.64±17.84	81.12±4.01	0.10

2.4 发酵液 VFA 含量

从表 8 中可以看出，随着锰含量的升高，发酵液乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸、总挥发性脂肪酸的含量都呈现先上升后下降的趋势。发酵液乙酸含量在锰含量为 40.00 mg/kg 时达到最大值 47.12 mmol/L，显著高于锰含量为 50.00、60.00 和 70.00 mg/kg 时（$P<0.05$），但与锰含量为 35.00 mg/kg 时差异不显著（$P>0.05$）；发酵液丙酸含量各处理间差异不显著（$P>0.05$），在锰含量为 40.00 mg/kg 时达到最大值 19.45 mmol/L；发酵液异丁酸含量各处理间差异不显著（$P>0.05$），在锰含量为 40.00 mg/kg 时达到最大值 0.35 mmol/L；发酵液丁酸含量各处理间差异不显著（$P>0.05$），在锰含量为 40.00 mg/kg 时达到最大值 5.41 mmol/L；发酵液异戊酸含量各处理间差异不显著（$P>0.05$），在锰含量为 40.00 mg/kg 时达到最大值 0.96 mmol/L；发酵液戊酸含量各处理间差异不显著（$P>0.05$），在锰

含量为40.00 mg/kg时达到最大值0.50 mmol/L；发酵液总挥发性脂肪酸含量在锰含量为40.00 mg/kg 时达到最大值 72.24 mmol/L，显著高于锰含量为 60.00 和 70.00 mg/kg 时（$P<0.05$），但与锰含量为 35.00 和 50.00 mg/kg 时差异不显著（$P>0.05$）；发酵液乙酸/丙酸在锰含量为 50.00 mg/kg 时达到最小值 2.05，显著低于锰含量为 35.00、40.00 和 60.00 mg/kg 时（$P<0.05$），但与锰含量为 70.00 mg/kg 时差异不显著（$P>0.05$）。

表 8　发酵底物锰含量对体外瘤胃发酵发酵液 VFA 含量的影响

Table 8　Effects of manganese content of fermentation substrate on VFA contents of fermentation fluid of *in vitro* rumen fermentation

项目	锰含量 Manganese content/(mg/kg)					*P* 值
Items	35.00	40.00	50.00	60.00	70.00	*P*-value
乙酸 ACE/(mmol/L)	44.20±4.98^{bc}	47.12±6.77^{c}	34.28±6.59^{ab}	31.41±8.95^{a}	27.42±6.64^{a}	0.02
丙酸 PRO/(mmol/L)	14.79±0.86	19.45±3.77	14.77±3.12	12.71±1.19	13.04±3.13	0.07
异丁酸 ISOB/(mmol/L)	0.25±0.03	0.35±0.10	0.26±0.07	0.24±0.08	0.20±0.05	0.18
丁酸 BUTY/(mmol/L)	4.11±0.03	5.41±0.97	4.15±0.84	3.39±0.39	3.43±1.04	0.05
异戊酸 ISOV/(mmol/L)	0.69±0.07	0.96±0.24	0.71±0.16	0.60±0.08	0.59±0.11	0.06
戊酸 VAL/(mmol/L)	0.31±0.02	0.50±0.15	0.32±0.11	0.26±0.04	0.26±0.09	0.06
总挥发性脂肪酸 TVFA/(mmol/L)	63.18±7.42^{ab}	72.24±13.06^{b}	54.48±10.79^{ab}	48.62±10.25^{a}	44.96±10.99^{a}	0.03
乙酸/丙酸 ACE/PRO	2.61±0.02^{b}	2.59±0.08^{b}	2.05±0.20^{a}	2.87±0.58^{b}	2.56±0.03^{ab}	0.03

3　讨　论

瘤胃发酵产气量的多少反映饲粮的降解程度[23]，产气量越高，表明饲粮发酵越充分，为机体提供的能量越多，越有利于动物的生长。本试验中产气量在锰含量为 35.00 mg/kg 时处于最高值，随着锰含量的增加，产气量逐渐降低，说明锰含量越高，越不利于瘤胃发酵。甲烷产量在锰含量为 60.00 mg/kg 时达到最高值。产气量降低，甲烷产量反而升高，意味着能量损失增大。在锰含量为 60.00 mg/kg 时，甲烷产量达到最高，为 8.01 mL，高效酸丙酸的含量达到最低，为 12.71 mmol/L，乙酸/丙酸达到最大,为 2.87，表明锰含量为 60.00 mg/kg 时不利于动物生长。从发酵液 MCP 含量结果来看，也恰恰证明了这一点，在锰含量为 60.00 mg/kg 时，发酵液 MCP 含量较低，此时瘤胃微生物活力低。pH 是瘤胃发酵的综合反映，受发酵底物类型、有机酸沉淀等各种因素的影响[24]，只有当 pH 处于正常范围之内，才能够保证瘤胃发酵、饲料降解的正常进行。本试验不同锰含量下体外瘤胃发酵后的发酵液 pH 在 7.03～7.49，属正常范围（5.60～7.50）。

DMD 直接反映饲粮在瘤胃中的降解程度。本试验中，DMD 随锰含量的升高呈现先上升后下降的趋势，在锰含量为 60.00 mg/kg 时达到最大值 68.73%。由此可见，锰含量为 60.00 mg/kg 时最有利于饲料的降解。锰可以显著促进瘤胃微生物对纤维素的降解。Martinez 等[25]研究表明，底物中锰含量为 5.00～30.00 mg/L 时，都能促进瘤胃微生物降解纤维素，而其中锰含量为 15.00 mg/L 时效果最佳。黄静龙[26]研究表明，40.00 mg/kg 锰组的饲粮表观消化率显著高于 120.00 mg/kg 锰组和 160.00 mg/kg 锰组。DMD 的结果与瘤胃消化道酶活力的测定结果基本吻合，发酵液 AMS、LPS、TYS 活力随锰含量的升高呈现先上升后下降的趋势，只有发酵液 CLS 活力随锰含量的升高呈现持续升高的趋势，并且都在锰含量为 40.00～60.00 mg/kg 时处于较高水平。因此从瘤胃消化酶活力和 DMD 的角度看，当锰的含量在 40.00～60.00 mg/kg 时，最有利于饲粮的降解。

NH_3-N 来源于饲粮中蛋白质的降解，主要用于微生物合成 MCP[27]，在瘤胃中基本处于动态平衡。本试验中的发酵液 NH_3-N 含量在 6.42~10.60 mg/dL，都处于正常范围（0.35～29.00 mg/dL[28-29]）。发酵液 NH_3-N 含量随着锰含量的升高呈现先上升后下降的趋势，并且在锰含量为 40.00 mg/kg 时达到最高值。MCP 提供了反刍动物机体 40%～60%的蛋白质需要量。发

酵液 MCP 含量随着锰含量的升高呈现先上升后下降的趋势，且在锰含量为 40.00 mg/kg 时达到最大值。由此可见，锰含量为 40.00 mg/kg 时，最有利于 NH_3-N 和 MCP 的形成。

VFA 是反刍动物重要的能量物质，提供了反刍动物 60%～80%的消化能[30-31]。乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸、总挥发性脂肪酸的含量都随着锰含量的升高呈现先上升后下降的趋势，都在锰含量为 40.00 mg/kg 时达到最高值，并且都在锰含量为 35.00～50.00 mg/kg 时处于较高水平。同时，对于反刍动物来说，为机体提供能量的物质主要是来源于肝脏组织中糖异生作用产生的葡萄糖，而丙酸是糖异生作用的重要前体物质，是一种高效酸，乙酸/丙酸越低，表明丙酸所占比例也越大，越利于反刍动物的生长。本试验中乙酸/丙酸在锰含量为 50.00 mg/kg 时达到最低值 2.05，最有利于瘤胃发酵过程中高效酸丙酸的生成。因此，从挥发性脂肪酸的角度看，当锰含量为 35.00～50.00 mg/kg 时，有利于瘤胃发酵能量物质的生成。

4 结 论

①对于生长期牦牛，若以甘氨酸锰作为锰元素添加形式，推荐牦牛饲粮锰含量在 40.00～50.00 mg/kg，有利于瘤胃发酵和饲草料降解。

②根据现有资料设定的牦牛饲粮中锰含量只有 33.82 mg/kg，远低于牦牛对锰的需要量 40.00～50.00 mg/kg，处于极度缺乏状态，必须额外补充微量元素锰，才能改善牦牛瘤胃发酵，提高生长性能。

参考文献：

[1] 朱国兴,张云玲.浅谈我国牦牛业生产现状及发展思路[J].中国畜牧杂志,2005,41(1):63–65.
[2] 韩兴泰,胡令浩.生长牦牛能量代谢的研究[J].青海畜牧兽医杂志,1993(1):13–16.
[3] 薛白,柴沙驼,刘书杰,等.生长期牦牛蛋白质需要量的研究[J].青海畜牧兽医杂志,1994,24(4):1–4.
[4] LEACH R M Jr,MUENSTER A M.Studies on the role of manganese in bone formation: Ⅰ.Effect upon the mucopolysaccharide content of chick bone[J].The Journal of Nutrition,1962,78(1):51–56.
[5] LEACH R M Jr,MUENSTER A M,WIEN E W.Studies on the role of manganese in bone formation: Ⅱ.Effect upon chondroitin sulfate synthesis in chick epiphyseal cartilage[J].Archives of Biochemistry and Biophysics,1969,133(1):22–28.
[6] 陈晓超,柯李晶,陈躬瑞,等.鹿茸粗提取液对大鼠成骨肉瘤细胞增殖的调节作用[J].中国中药杂志,2004,29(1):74–77.
[7] 李克强,郑洪新,朱辉,等.鹿茸复方提取物对骨质疏松症干预作用[J].中国公共卫生,2011,27(8):1016–1017.
[8] 贺文彬,张俊龙,薛薇,等.鹿茸醇提取物对大鼠海马长时程增强的易化作用[J].中药新药与临床药,2009,20(5):401–403.
[9] 吴爱芝,王晓琴,卢文彪,等.生物体系中含锰金属酶模型配合物的结构研究进展[J].广州化学,2005,30(2):57–61.
[10] 郗丽兰.微量元素锰的生理功能[J].陕西粮油科技,1990(2):28–31.
[11] 庄怀飞,侯明海,李彦芹,等.不同铜、锰水平对荷斯坦种公牛血清抗氧化指标的影响[J].中国农学通报,2009,25(4):1–5.
[12] 纪守坤,许贵善,刁其玉,等.不同饲喂水平对肉用羔羊矿物质消化代谢的影响[J].饲料工业,2012,33(11):43–47.
[13] 胡令浩.牦牛营养研究论文集[M].西宁:青海人民出版社,1997.
[14] MENKE K H,RAAB L,SALEWSKI A,et al.The estimation of the digestibility and

metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*[J].The Journal of Agriculture Science,1979,93(1):217–225.

[15] 郝力壮,柴沙驼,崔占鸿,等.应用体外产气法评定青海省青稞营养价值[J].西北农业学报,2009,18(6):70–72.

[16] 张晓卫,郝力壮,王万邦,等.体外产气法评定燕麦营养价值[J].饲料研究,2012(9):61–64.

[17] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.GB/T 13885–2003 动物饲料中钙、铜、铁、锰、镁、钾、钠和锌含量的测定原子吸收光谱法[S].北京:中国标准出版社,2003.

[18] 冯宗慈,高民.通过比色测定瘤胃液氨氮含量方法的改进[J].畜牧与饲料科学,2010,31(6/7):40–41.

[19] 丁学智.单宁酸对瘤胃发酵特性及甲烷产量的影响[D].硕士学位论文.兰州:甘肃农业大学,2006.

[20] 郭雪峰.内蒙古白绒山羊甲烷产生量估测模型的建立及其影响因素的研究[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2008.

[21] 曹庆云,周武艺,朱贵钊,等.气相色谱测定羊瘤胃液中挥发性脂肪酸方法研究[J].中国饲料,2006(24):26–28.

[22] 王加启.反刍动物营养学研究方法[M].北京:现代教育出版社,2011:139–141.

[23] 哈斯花.体外发酵产气技术在饲料营养价值评定中的作用[J].当代畜禽养殖业,2013(1):15–19.

[24] 高天爽,孙海霞,谢小来,等.日粮中高粱替代玉米对绵羊瘤胃发酵的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2014(9):7–10.

[25] MARTINEZ A,CHURCH D C.Effect of various mineral elements on *in vitro* rumen cellulose digestion[J].Journal of Animal Science,1970,31(5):982–990.

[26]黄静龙.不同硒、锰水平对奶牛乳品质、血液生化指标的影响及消化代谢规律的研究[D].硕士学位论文.泰安:山东农业大学,2005.

[27] LENG R A,NOLAN J Y.Nitrogen metabolism in the rumen[J].Journal of Dairy Science,1984,67(5):1072–1089.

[28] SLYTER L L.Monensin and dichloroacetamide influences on methane and volatile Fatty Acid production by rumen bacteria *in vitro*[J].Applied and Environmental Microbiology,1979,37(2):283–288.

[29] COLEMAN G S,SANDFORD D C.The uptake and utilization of bacteria,amino acids and nucleic acid components by the rumen ciliate *Eudiplodinium maggii*[J].Journal of Applied Bacteriology,1979,47(3):409–419.

[30] GRAY G M.Starch digestion and absorption in nonruminants[J].The Journal of Nutrition,1992,122(1):172–177.

[31] 赵国琦,贾亚红,陈小连,等.不同NDF/NFE比的日粮对山羊瘤胃发酵参数影响的研究[J].中国畜牧杂志,2006,42(13):29–33.

Effects of Manganese Content in Fermentation Substrate on *in Vitro* Rumen Fermentation of Yaks

LIU Huili[1,2,3] XUE Yanfeng[1,2,3*] HAO Lizhuang[1,2,3**] LIU Shujie[1,2,3**] CHAI Shatuo[1,2,3] ZHANG Xiaowei[1,2,3]

(1. *State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Key Laboratory of Plateau Grazing Animal Nutrition and Feed Science of Qinghai Province, Xining* 810016, *China;* 2. *Qinghai*

*Contributed equally

**Corresponding author: HAO Lizhuang, associate professor, E-mail: lizhuanghao1122@foxmail.com; LIU Shujie, professor, E-mail: mkylshj@126.com (责任编辑 王智航)

Plateau Yak Research Center, Xining 810016, *China*; 3. *Academy of Science and Veterinary Medicine of Qinghai University, Xining* 810016, *China*)

Abstract: In order to find manganese requirement of yaks, manganese bisglycinate was used as additive in this experiment to investigate the effects of different contents of manganese in fermentation substrate on *in vitro* rumen fermentation of yaks. Five manganese contents in fermentation substrate were designed, which were 35.00, 40.00, 50.00, 60.00 and 70.00 mg/kg, respectively. The fermentation lasted for 48 h using *in vitro* rumen fermentation method. After fermentation, gas production, rumen fermentation characteristics and digestive enzyme activities were measured. The results showed as follows: 1) when the content of manganese was 40.0 mg/kg, the contents of ammonia nitrogen, microbial protein, acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaloric acid, valeric acid and total volatile fatty acids in fermentation fluid reached the highest, which were 10.60 mg/dL, 3.90 g/L, 47.12 mmol/L, 19.45 mmol/L, 0.35 mmol/L, 5.41 mmol/L, 0.96 mmol/L, 0.50 mmol/L and 72.24 mmol/L, respectively; 2) when the content of manganese was 50.00 mg/kg, lipidase activity in fermentation fluid reached the highest as 0.50 U/mL, and acetic acid/propionic acid in fermentation fluid reached the lowest, as 2.05. Therefore, the manganese content recommended in diet for growing yaks is between 40.00 and 50.00 mg/kg， when using manganese bisglycinate as additive， which is help to rumen fermentation and forage degradation.

Key words: yak; manganese bisglycinate; *in vitro* rumen fermentation; digestive enzyme activity